中華農業研究（Jour. Agric. Res. China）47(4)：338～345（1998）

# 水稻臺農 67 號胚癒合組織之誘導及再生力研究[1]

夏奇鈮　王強生[2]

**摘要**：利用生物科技基因轉殖技術可加速植物品種改良之腳步，而建立一穩定之高再生系統則是基因轉殖成功之先決條件。本試驗利用本省普遍栽培之水稻品種台農 67 號，以取得最容易之成熟種子爲癒合組織材料來源，探討影響癒合組織再生能力之各項因子，以期提高其再生力，未來將利用此一再生系統進行水稻之基因轉殖。首先比較鹽類培養基對誘導癒合組織形成之影響，台農 67 號在 N6 鹽類培養基中比 MS 鹽類培養基有較高之癒合組織誘導率，台北 309、台中在來 1 號之癒合組織誘導率在這兩種鹽類培養基中並無差異。各品種癒合組織形成率分別爲台北 309 之 94.6%、台中在來 1 號 80.5%、及台農 67 號 50.8%。胚狀細胞培養基中添加脯胺酸之研究顯示，脯胺酸處理對提高胚狀細胞之再生力有顯著影響。添加或不添加脯胺酸所誘導生成之胚狀細胞，繼代後再生力分別爲 100%與 66.7%，顯示添加脯胺酸可保持胚狀細胞之高再生能力。提高培養基滲透壓以促進再生力之研究顯示，以凝固基質 agarose 10 g/l 處理有最高之再生力（41%），5 g/l phytagel（14.5%）其次，而以 bacto-agar 16 g/l 最差（0%）。碳源處理對再生力之影響，以麥芽糖 30 g/l 處理之再生力（20%）顯著較蔗糖（2.2%）或蔗糖加麥芽糖組合處理（0%）爲高。培養細胞天齡對再生力影響之研究顯示，胚狀細胞隨著培養天齡之增加再生力逐漸降低，其中又以蔗糖爲碳源之處理，再生力下降較爲顯著，18 天齡胚狀細胞再生力爲 87.5 %，42 天齡胚狀細胞再生力則只剩 40%；如以麥芽糖爲碳源，42 天齡之胚狀細胞仍有 95%之再生力。因此對較高天齡之胚狀細胞，建議採用麥芽糖爲再生培養基之碳源，可得較高之再生力。本試驗比較兩種促進芽體生長之培養基 N6 salt + kinetin vs. MS salt + BA，在芽體抽長率及分蘗平均數上兩培養基並無顯著差異。

**關鍵詞**：水稻、癒合組織誘導、芽體再生。

## 前　言

水稻是全球最重要的糧食作物，累積有許多有關細胞再生之研究，歸納這些研究中影響水稻細胞再生較重要之因子有：品種或基因型，培植體來源（莖基部、花藥、成熟胚、未成熟胚），培養基（鹽類、醣類、凝固基質），培養時間等[2,7,8,14,16,17]。常被使用來提高培植體再生力之方法包括：水分逆境處理如乾燥失水[15,19]、高滲透壓培養基添加醣醇或提高凝固基質濃度[9,12,18]、改變碳源[1]及添加氨基酸[3]等。以培植體的再生力而言，花藥及未成熟胚雖較其他培植體有較高之再生力[2, 4,11,14, 20]，然而在材料的供應上有很大的限制，站在農業研究機關之立場，我們最後之目標爲生產基因轉殖水稻，因此利用

1. 臺灣省農業試驗所　研究報告第 1957 號。
2. 本所農藝系助理研究員、副研究員。臺灣省　臺中縣　霧峰鄉。

隨時且可大量取得之成熟種子爲材料，可增加未來被利用在轉殖系統之可行性；早期之細胞再生研究常以再生力較高之品種爲主[16]，然而這些高再生力之品種往往並非廣泛栽培之優良品種，因此減低了這些再生研究在基因轉殖上之應用性；台農 67 號是目前台灣普遍栽培的水稻品種，栽培歷史悠久具有許多優良的食用及農藝栽培性狀，值得我們深入瞭解其細胞再生培養之各種特性，以便提高其再生力進而建立其基因轉殖系統，未來利用此一基因轉殖系統可將各種抗病、抗蟲、及特殊成分之基因導入，提高其附加價值增加農民收益。本報告以台農 67 號成熟種子誘導生成之癒合組織爲再生材料，針對上述影響再生之各項因子加以測試比較，以做爲日後改進台農 67 號水稻品種再生系統之依據。

## 材料與方法

台農 67 號之成熟種子去殼後以稀釋 2 倍之 Clorox（5.25% NaOCl）溶液消毒 30 mins, 再以無菌水清洗 3 次。基本培養基爲 N6 鹽類添加 MS 維生素、30 g/l 蔗糖與 3 g/l phytagel。自種子胚盤處長出具胚分化能力之癒合組織（胚狀細胞）將做爲繼代或再生試驗之用。除試驗一使用不同的品種外，其餘試驗皆以台農 67 號爲材料。

### 一、 比較 N6[4]與 MS[13] 鹽類培養基對癒合組織形成之影響

本試驗以台中在來 1 號、台北 309 與台農 67 號之成熟種子經無菌消毒後，植入含有 2 mg/l 2,4-D 之 N6 或 MS 基本培養基置於暗處培養，其中 MS 培養基並添加 10%椰子水，觀察由成熟種子誘導癒合組織之生長及分化情形。

### 二、脯胺酸對胚狀細胞再生力之影響

將 35 天齡之癒合組織置於胚分化培養基上培養，胚分化培養基爲上述基本培養基添加 300 mg/l casein hydrolysate, 與 1 mg/l 2,4-D，以促進胚狀細胞之分化。並以添加或不添加 1.15 g/l （10 mM）脯胺酸處理之。經 15 天暗培養後所產生之胚狀細胞，移至下述再生培養基於 16 小時光照環境下繼續培養，經 15 天後調查再生率（產生綠點之胚狀細胞百分比）。基本再生培養基爲 N6 鹽類添加 MS 維生素及 100 mg/l inositol、1 mg/l thiamine、2 mg/l kinetin、0.1 mg/l NAA、45 g/l 蔗糖與 5 g/l phytagel。

### 三、不同凝固基質與碳源對水稻胚狀細胞再生力之影響

除糖與凝固基質各處理不同外，基本之再生培養基同上所述。比較凝固基質試驗中，蔗糖濃度固定爲 30 g/l，凝固基質之種類及所使用之濃度則如表 2。比較碳源（蔗糖、麥芽糖各 30 g/l 及兩種糖之組合）之試驗中凝固基質均爲 5 g/l phytagel。本試驗以 77 天齡之胚狀細胞作爲材料，經 3 週培養後調查再生率。

### 四、不同天齡胚狀細胞再生力之比較

基本再生培養基以 10 g/l agarose 爲凝固基質，碳源則分別爲 30 g/l 麥芽糖及 30 g/l 蔗糖。比較由成熟種子分化而來之不同天齡胚狀細胞其（18、42、98、138、238、266 天）再生力之變化。

### 五、再生芽體生長培養基之比較

再生苗生長培養基（N）爲上述基本培養基（N6）添加 2 mg kinetin 及 0.1 mg NAA。再生苗培養基（M）爲 MS 鹽類添加 1 mg/l BA 及 8 g/l bacto-agar，其他成分則與培養基 N 相同。胚狀細胞經二週再生培養後，移至再生苗生長培養基 N 或 M，經三週培養後調查大於 1 cm 再生苗產生之百分比及每個胚狀細胞培植體上之平均芽數。

### 六、 統計方法

試驗所得數據利用 SAS 程式計算分析其結果，經變方分析後若處理效果顯著，則利用最小顯著性測驗(LSD, least significant difference) 在 5%顯著差異水準下進行平均值顯著性測驗。

## 結果與討論

### 一、比較 N6 與 MS 鹽類培養基對癒合組織形成之影響

品種（台中在來 1 號、台北 309 與台農 67 號）及培養基鹽類（N6、MS 培養基）對癒合組織形成之影響皆顯著（資料未列出）。如各品種分開來看，台中在來 1 號與台北 309 對培養基鹽類之選擇並不顯著；台農 67 號則以 N6 培養基較 MS 培養基爲佳。各品種癒合組織形成率如表 1，平均形成率爲台北 309 之 94.6%、台中在來 1 號 80.5%及台農 67 號 50.8%。

**表 1.** 不同鹽類培養基對水稻品種胚癒合組織形成之影響

**Table 1.** Effect of medium salt formulation on callus induction of three rice varieties.

| Salt formulation [z] | Callus formation % [y] | | |
|---|---|---|---|
| | Variety | | |
| | Taichung native 1 | Taipei 309 | Tainung 67 |
| N6 | 82±9.8[a] | 93±4.4[a] | 63±10.3[a] |
| MS | 79±6.7[a] | 96±6.3[a] | 39±17.8[b] |

[z] Basal medium containing N6 or MS salts with 2 mg/1 2, 4-D, 30g/l sucrose and 3g/l phytagel.

[y] Means in the same column followed by the same letter are not significantly different at the 5 % level by LSD test.

誘導水稻胚形成癒合組織所採用之培養基相當廣泛，MS、N6、 B5 及改良後之 MS、White 培養基皆曾被使用，顯示誘導水稻癒合組織之生成並不困難[5]。雖然如此，仍有報告指出水稻不同品種、基因型癒合組織形成能力有極大差異[11,17]。本試驗以本省栽培面積最廣之台農 67 號、再生能力較高之台北 309、及秈稻品種台中在來 1 號進行比較。台中在來 1 號與台北 309，一爲秈稻一爲稉稻品種，但在試驗所採用的兩種不同鹽類培養基上，癒合組織形成率並無顯著差異；台農 67 號與前述兩品種相較，癒合組織形成率較低，鹽類培養基對癒合組織形成率之影響亦較顯著，其中以 $NO_3^-/NH_4^+$較高之 N6 培養基對癒合組織形成有促進之效果。台農 67 號雖爲優良栽培品種，但其癒合組織形成率與參試之其他兩品種相較並不高，這也說明了爲什麼在水稻再生研究中，台農 67 號不如台北 309 被普遍採用之原因。而台北 309 胚狀癒合組織之高形成率則使其成爲水稻再生研究中經常被採用之材料[16]；根據本試驗之結果，不同品種在鹽類培養基的選擇上並非絕對，品種本身癒合組織的生成能力才是造成差異之最大原因，因此對癒合組織形成力較低之品種，找出該品種最適當之培養基，利用其與不同培養基間的交感提高其形成或再生力。

### 二、脯胺酸對胚狀細胞再生力之影響

添加脯胺酸對胚狀細胞再生力結果顯示有顯著之影響，自添加脯胺酸培養基上所產生之胚狀細胞再生率可達 100%；而取自未添加脯胺酸處理所生成之胚狀細胞再生力爲 66.7%，兩者間差異顯著（5%顯著水準）。水稻胚狀細胞之長期培養一直是亟待突破之問題，因爲隨著胚狀細胞繼代次數的增加亦即培養細胞天齡的增加其再生力逐漸下降[14,20]。前人研究指出有機態氮源可提高水稻之再生力，培養基中添加胺基酸有助於水稻細胞之再生[3]。Liu and Lai (1991) 之研究發現經水分逆境處理後，高再生力、及低再生力品種之水稻細胞其脯胺酸含量皆有增加，但高再生力培植體之脯胺酸含量爲低再生力品種之兩倍，顯示高、低再生力水稻品種間，內生性脯胺酸確有不同。本試驗亦證實外加之脯胺酸可維持或促進胚狀細胞之再生力，此結果與 Chowdhry *et al.* (1993) 之研究結果相同，亦即雖然添加脯胺酸對促進癒合組織的形成不顯著，但可明顯促進其後胚狀細胞之分化或延遲胚狀細胞分化力之降低，

並反應於再生力之提高，因此 Chowdhry *et al.* 推測某些胺基酸之合成可能爲器官分化或體胚再生所需。

## 三、比較不同凝固基質、碳源對促進水稻胚狀細胞再生力之影響

本試驗將一般胚狀細胞培養所使用凝固基質濃度加倍，以增加再生培養基之滲透壓，結果顯示凝固基質處理對再生率有顯著影響達 1%顯著水準，其中以 agarose 10 g/l 再生效果最好達 41%，5 g/l phytagel 之 14.5%次之，而以 bacto-agar 16 g/l 爲凝固基質之再生力最差爲 0%（表 2）。碳源處理對再生力之影響亦達 1%之顯著水準，麥芽糖處理之再生率 20%比蔗糖處理之 2.2%或蔗糖加麥芽糖組合之 0%爲佳（表 2）。在這兩個試驗中，凝固基質試驗中之 phytagel 處理與碳源試驗中之單獨蔗糖處理，有完全相同之配方（30 g/l 蔗糖，5g/l phytagel），雖然結果顯示單獨蔗糖處理之再生率較低（2.2% vs. 14.5%），但兩處理在統計上並無顯著差異。Lai and Liu (1988) 指出高再生力水稻品種較低再生力品種之癒合組織水分含量低 10%，此結果呼應於同樣 Liu and Lai (1991) 之研究，提高再生培養基之滲透壓，以降低細胞之水分含量，可促進水稻細胞之再生。Etienne *et al.* (1991) 之研究亦認爲培養細胞之相對水分含量與水分潛勢是胚分化的指標。一般而言，水分逆境處理可利用失水、高滲透壓培養基，如提高凝固基質濃度或添加醣醇來達成，在碳源試驗中之蔗糖加麥芽糖處理，理論上具有較高之培養基滲透壓，但對再生力並無提高之效果，因爲本研究在提高凝固基質濃度及碳源處理試驗中，並未測定各處理間培養細胞之水分潛勢，因此對三種凝固基質與碳源處理所造成之水分逆境在培養細胞水分潛勢上之影響無法加以比較。綜合此二試驗之結果，推測碳源處理可提高再生力之作用機制，可能非僅影響培養細胞之水分含量而已，再生試驗中經由水分逆境或醣類代謝不同之處理，最後導致相同結果（提高再生力），其間引發之相同或不相同之連鎖反應，則值得我們做進一步探討。

**表 2.** 比較凝固基質、碳源處理對臺農 67 號胚癒合組織再生之影響

**Table 2.** Effect of gelling agents and source of carbohydrate on regeneration of rice cv. Tainung 67 embryogenic callus.

| Gelling agent (g/l) [z] | Regeneration (%) [y] |
|---|---|
| Agarose 10 | 41.0[a] |
| Bacto-agar 16 | 0.0[c] |
| Phytagel 5 | 14.5[bc] |
| Carbohydrate (g/l) | |
| Sucrose 30 | 2.2[bc] |
| Maltose 30 | 20.0[b] |
| Sucrose 30 + maltose 30 | 0.0[c] |

[z] Basal medium containing N6 salts, MS vitamins, 2mg/l kinetin and 0.1 mg/l NAA with 30g/l sucrose for the gelling agent experiment and 5g/l phytagel for the source of carbohydrate experiment, respectively.

[y] The different letters indicate significantly different at the 5 % level by LSD test.

## 四、不同天齡胚狀細胞再生力之比較

在兩種不同碳源（蔗糖、麥芽糖）之再生培養基中，再生力皆隨著胚狀細胞天齡之增加而降低，其中又以蔗糖爲碳源之處理其平均再生力較低，再生力遞減之情形亦較顯著，42 天齡胚狀細胞再生力僅及 18 天齡胚狀細胞之半（87.5% vs. 40%）（表 3），以麥芽糖爲碳源之再生培養基中，42 天齡胚狀細胞仍可維持 95%之再生力，對較高天齡之胚狀細胞（98、138、238、266 天）在麥芽糖爲碳源之

再生培養基中，其平均再生力亦較蔗糖培養基爲高。培養天齡較少之胚狀細胞（18 天），二種碳源處理間並未對再生力造成顯著差異（表 3）。對天齡較少之胚狀細胞而言，因其具較高之再生力，碳源處理之影響效果並不顯著；對經過數次繼代、培養時間較久之高天齡胚狀細胞而言，改變再生培養基中之碳源，對促進再生力則有顯著之效果。綜合來看，顯示再生力高之幼齡胚狀細胞，碳源種類影響並不顯著，而麥芽糖具有提高（或維持）高天齡胚狀細胞再生力之效果。此外本試驗中不同天齡之胚狀細胞養成於不同之時間，爲改進材料批次間可能之不均質性，我們改以同一時間誘導之胚狀細胞，經長期培養並持續調查其再生力變化之情形，亦有相同結果（資料未列出）。Asano *et al.* (1994) 以 35 月齡之 japonic rice 培養細胞爲材料，發現相對於蔗糖的 0%再生率，以乳糖或麥芽糖爲培養基碳源之處理，仍可得到 2-4%之再生率，因此推論再生力之下降，部分原因可能是因爲培養條件之不適，而非完全受遺傳基因（老化）調控之改變。本試驗中麥芽糖與蔗糖處理提供相同之滲透壓，因此滲透壓引起細胞水分含量改變之理論並不足以解釋麥芽糖對高天齡培養細胞再生力提高之現像。如果將胚狀細胞長期培養於含麥芽糖代替蔗糖之培養基，再以含蔗糖之再生培養基培養，比較其再生力之變化，或可探討 1. 麥芽糖碳源究竟是提高再生力還是延緩再生力之降低 2. 單純培養基醣類改變之刺激或是特定醣類在一定之生長發育階段具有特別之促進作用 3. 胚狀細胞再生力之降低僅受天齡之影響（遺傳基因調控），這些都是我們日後要繼續探討之問題。

表 3. 不同天齡胚癒合組織再生力之比較

Table 3. The influence of aging of embryogenic callus on regeneration of rice cv. Tainung 67.

| Age of embryogenic callus (day-old) | Regeneration Frequency (%) [z] | |
|---|---|---|
| | Sucrose | Maltose |
| 18 | 87.5[a] | 87.5[a] |
| 42 | 40[b] | 95[a] |
| 98 | 0[c] | 42.5[b] |
| 138 | 10[c] | 37.5[b] |
| 238 | 17.5[c] | 45[b] |
| 266 | 2[c] | 27.5[b] |

[z] The different letters indicate significantly different at the 5 % level by LSD test.

## 五、再生芽體生長培養基之比較

水稻細胞培養之再生力，常以具綠點胚狀細胞之百分比，並記錄長成綠色幼苗之比率爲參考 (1)，主要原因爲這些綠點胚狀細胞未必能全部都能長成幼苗，因此如能提高芽點胚狀細胞長成植物體之比率，對再生力之提高有相同之重要性。比較兩種芽體生長培養基，以 N6 鹽類爲主之培養基 N，其芽體抽長百分比爲 21.2%、平均分櫱數爲 1.9；以MS鹽類爲主之培養基M，其芽體抽長百分比爲 11.8%、平均分櫱數爲 1.0（表 4）。雖然培養基N有較高之芽體抽長率，且芽體亦具有較多之分櫱數，但在統計上這兩種培養基差異並不顯著。如果追溯先前再生培養基的影響（麥芽糖處理有較高之再生率），以蔗糖爲碳源之培植體處理在 N 培養基有 15.6%芽體抽長率，在 M 培養基有 8%芽體抽長率，以麥芽糖爲碳源處理之培植體在N培養基有 27.5%芽體抽長率，在M培養基有 17.1%芽體抽長率。考慮先前再生培養基造成培植體生理狀態的改變，因此將不同再生培養基而來之培植體分開統計，雖然在數字上 N 培養基比 M 培養基較佳，但仍未達顯著水準，培植體個別差異大亦爲原因之一。在分櫱平均數

上兩培養基並無差異，亦即所使用之 2 mg/l BA 或 1 mg/l kinetin 在促進分蘗效果上並無不同。Asano *et al.* (1994)指出含麥芽糖之培養基不僅誘導再生，且毋須再繼代至含蔗糖之培養基，芽體可直接抽長，因此推論麥芽糖可能是主要營養源，可直接用於植物體之代謝，而本試驗之兩培養基均以蔗糖爲碳源，因此在此一觀點上無法加以比較。

**表 4.** 再生芽體生長培養基之比較

**Table 4.** Comparison two media on elongation regenerants of rice cv. Tainung 67.

| Regenerant | Elongation medium | | | |
|---|---|---|---|---|
| | N[z] | | M[y] | |
| from medium containing | Elongated shoot % | Mean shoots/ explant | Elongated shoot % | Mean shoots/ explant |
| Sucrose | 15.6 | 1.8 | 8.0 | 0.6 |
| Maltose | 27.5 | 2.0 | 17.1 | 1.6 |
| Mean[x] | 21.2[a] | 1.9[a] | 11.8[a] | 1.0[a] |

[z] Medium N: N6 salts with MS vitamins, 100mg/l inositol, 1 mg/l thiamine, 2mg/l kinetin, 0.1mg/l NAA, 30g/l sucrose and 3g/l phytagel.

[y] Medium M: Same as medium N except using MS salts with 1mg/l BA and 8g/l bacto-agar.

[x] The different letters indicate significantly different at the 5 % level by LSD test for each percentage of elongated shoot and mean number of shoots per explant.

## 引用文獻


1. Asano, Y., Y. Ito, M. Ohara, K. Sugiura, and A. Fujiie. 1994. Improved regeneration response of creeping bentgrass and japonica rice by maltose and lactose. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 39：101-103.
2. Chen, C. C., H. S. Tsay, and C.R. Huang. 1991. Factors affecting androgenesis in rice. pp.193-215. in：Biotechnology in agriculture and forestry. Vol.14 Rice. (Bajaj, Y. P. S. ed.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany.
3. Chowdhry, C. N., A. K. Tyagi, N. Maheshwari, and S. C. Maheshwari. 1993. Effect of L-proline and L-trytophan on somatic embryogenesis and plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L. cv. Pusa 169). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 32：357-361.
4. Chu, C. C. 1978. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops. pp. 43-50. in：Proc Symp Plant Tissue Culture. (Hu, H. ed.) Science Press, Pecking, China.
5. Croughan, T. P., and Q. R. Chu. 1991. Rice (*Oryza sativa* L.)：Establishment of callus cultures and the regeneration of plants. pp.19-37. in：Biotechnology in agriculture and forestry. Vol.14 Rice (Bajaj, Y. P. S. ed.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany.
6. Etienne, H., A. Berger, and M. P. Carron. 1991. Water status of callus from Hevea brasiliensis during induction of somatic embryogenesis. Physiol. Plant. 82：213-218.
7. Finch, R. P., A. Baset, I. H. Slamet, and E. C. Cocking. 1992. In vitro shoot culture of wild *Oryza* and other grass species. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 30：31-39.
8. Hartke, S., and H. Lorz. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration from various indica rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. Genet. & Breed. 43：205-214.
9. Jain, R. K., S. Jain, and R. Wu. 1996. Stimulatory effect of water stress on plant regeneration in aromatic indica rice varieties. Plant Cell Rep. 15：449-454.
10. Lai, K. L., and L. F. Liu. 1988. Increased plant regeneration frequency on water-stressed rice tissue cultures. Japan. Jour. Crop

Sci. 57：553-557.

11. Liu, L. F., and K. L. Lai. 1982. A comparison of callus induction and plant regeneration from young embryos of different rice varieties. Natl. Sci. Counc. Monthly 10：135-143.

12. Liu, L. F., and K. L. Lai. 1991. Enhancement of regeneration in rice tissue cultures by water salt stress. pp.47-57. in：Biotechnology in Agriculture and forestry Vol.14 Rice (Bajaj, Y. P. S. ed.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany.

13. Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant 15：473-497.

14. Ozawa, K., and A. Komamine. 1989. Establishment of a system of high-frequency embryogenesis from long-term cell suspension cultures of rice (*Oryza sativa L.*). Thero. Appl. Genet. 77：205-211.

15. Rance, I. M., W. Tian, H. Mathews, A. de Kochko, R. N. Beachy, and C. Fauquet. 1994. Partial desiccation of mature embryo-derived calli, a simple treatment that dramatically enhances the regeneration ability of indica rice. Plant Cell Rep. 13：647-651.

16. Rueb, S., M. Leneman, R. A. Schilperoort, and L. A. M. Hensgens. 1994. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 36：259-264.

17. Seraj, Z. I., Z. Islam, M. O. Faruque, T. Devi, and S. Ahmed. 1997. Identification of the regeneration potential of embryo derived callus from various indica rice varieties. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 48：9-13.

18. Suprasanna, P., T. R. Ganapathi, and P. S. Rao. 1995. Establishment of embryogenic callus, somatic embryos and plant regeneration in indica rice. J. Genet. & Breed 49：9-14.

19. Tsukahara, M., and T. Hirosawa. 1992. Simple dehydration treatment promotes plantlet regeneration of rice *(Oryza sativa L.)* callus. Plant Cell Rep. 11：550-553.

20. Wenjing T., L. Bao, and X. Miao. 1997. Establishing japonic rice suspensions retaining a high regeneration potential after 14 months of culture. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 47：213-216.

# Callus Induction and Shoot Regeneration from Mature Seed of Rice Tainung 67 (*Oryza sativa* L.) [1]

Chi-Ni Hsia and Chang-Sheng Wang [2]

## Summary

The production of transgenic plants has a great potential for crop improvement however a reliable and efficient regeneration system is a prerequisite for gene transformation. The objectives of this study were to investigate the effects of salt formulation, carbon source, proline, water stress and callus aging on plant regeneration from mature seed-derived callus culture of cultivar Tainung 67 (TNG 67), a popular rice variety in Taiwan. Callus was initiated from mature seeds of three cultivars Taipei 309 (TP309), Taichung native 1 (T(N)1) and TNG67 on two salt formulations (N6 and MS) with an average callus formation frequency of 94.6%, 80.5% and 50.8% for each variety, respectively. Although it was found that callus formation better on N6 medium than MS medium for TNG67, no difference was observed on callus formation of T(N)1 and TP309 on both salt formulations. A significant effect of proline on enhancement of embryogenic callus regeneration was observed. A 100% regeneration frequency was obtained from embryogenic calli grown on proline treatment (1.15 g/l) however only 66.7% for the control (without proline). The water stress treatments including the use of 1% agarose, 0.5% phytagel and 1.6% bacto-agar were found with 41%, 14.5% and 0% frequency of regeneration, respectively. The decreasing regeneration frequency was observed along with increasing of long-term cultures. A 87.5% frequency of regeneration was obtained from the 18-day-old embryogenic callus and only 40% remained for the 42-day-old embryogenic callus on a regeneration medium containing sucrose. Meanwhile, a higher regeneration frequency (95%) was obtained for the 42-day-old embryogenic callus grown on a regeneration medium containing maltose. Medium of N6 and MS salt formulation with kinetin and BA respectively were tested for shoot elongation however no significant difference was found.

**Key words**： *Oryza sativa* L., Callus induction, Regeneration.

---

1. Contribution No. 1957 from Taiwan Agricultural Research Institute.
2. Respectively, Assistant Researcher and Associate Researcher of Agronomy Department, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.